动 物 学 研 究 2005, Dec. 26 (6): 622-626
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

非洲爪蟾血清白蛋白的分离纯化及胰蛋白酶抑制活性

张英霞[1,2], 李文辉[1], 张 云[1,*]
(1. 中国科学院昆明动物研究所 毒素研究室, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 通过凝胶过滤层析及两步阴离子交换层析, 从非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的血清中获得了其 68 kDa 的血清白蛋白。与大蹼铃蟾血清白蛋白相似, 非洲爪蟾血清白蛋白也具有抑制胰蛋白酶的活性, 但其抑制活力相对较低, 180 nmol/L 的非洲爪蟾血清白蛋白能抑制 84% 的胰蛋白酶活性 (30 nmol/L)。经表面等离子共振法获得了其与胰蛋白酶的结合动力学常数, 解离平衡常数 $K_D = 1.44 \times 10^{-6}$ mol/L。经 Western blot 分析发现, 非洲爪蟾的皮肤中也分布有血清白蛋白。推测两栖类动物血清白蛋白具有的胰蛋白酶抑制活性可能是其抵御天敌捕食的一种防御措施。

关键词: 两栖类; 非洲爪蟾; 血清白蛋白; 胰蛋白酶抑制剂
中图分类号: Q959.5; Q512 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853 (2005) 06-0622-05

Purification and Trypsin Inhibitory Activity of *Xenopus laevis* Serum Albumin

ZHANG Ying-xia[1,2], LEE Wen-hui[1], ZHANG Yun[1,*]
(1. *Department of Animal Toxinology, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan* 650223, *China*;
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*)

Abstract: Frog albumin (XpA-serum) was purified from serum of *Xenopus laevis* by a combination of gel filtration and ion exchange chromatography steps. Like *Bombina maxima* albumin, XpA-serum exhibited trypsin inhibitory activity, which was lower than that of *B. maxima* albumin. XpA-serum at the concentration of 180 nM inhibited 84% activity of trypsin (30 nM). The equilibrium dissociation constants (K_D) is 1.44×10^{-6} M as determined by Surface Plasmon Resonance. Western blot analysis revealed that XpA-serum was also distributed in the skin. It is deduced that serum albumin of amphibian possessing trypsin inhibitory activity can function directly or indirectly as a defensive substance against predators.

Key words: Amphibian; *Xenopus laevis*; Serum albumin; Trypsin inhibitor

血清白蛋白是脊椎动物血浆中含量最丰富的蛋白质, 约占血浆总蛋白的一半。它具有重要的生理功能, 如结合许多内源及外源性组分, 维持血液的胶体渗透压, 清除自由基, 抑制血小板聚集, 抗凝血, 及影响动脉血管的渗透性等 (Peters, 1996)。人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 是研究得较为清楚的白蛋白: 成熟蛋白由 585 个氨基酸组成, 含有 35 个半胱氨酸, 形成 17 对二硫键。HSA 由 3 个序列相似的结构域 (Ⅰ-Ⅲ) 组成一个心形的分子, 每个结构域又含两个亚结构域 (A 和 B)。其分子内的二硫键以相同的排列方式重复 3 次, 而且其原子结构具有序列内部的同源性, 所以目前普遍认为血清白蛋白是从一个由 190 个氨基酸组成的祖先蛋白通过 3 次重复进化而来的 (Sugio et al, 1999)。

某些种类的两栖动物, 在生长发育过程中血清

收稿日期: 2005-08-02; 接受日期: 2005-09-01
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170195, 30470380); 云南省自然科学基金资助项目 (2003C0066M); 中国科学院西部之光项目

* 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0871-5198515, Fax: 0871-5191823, E-mail: zhangy@mail.kiz.ac.cn

白蛋白的表达水平不同，即变态期表达量增加，而成年后表达量则降低，所以认为两栖动物的血清白蛋白是激素及发育调控的蛋白质（Follett & Redshaw，1974）。与多数脊椎动物只有一种血清白蛋白不同，非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）血清白蛋白却有两个 cDNA 序列，并由此推导出 68 和 74 kDa 成熟血清白蛋白，两者的序列相似度为 89%（Moskaitis et al，1989）。

本实验室曾经从大蹼铃蟾（*Bombina maxima*）皮肤及血清中分离纯化到白蛋白（BmA-skin，BmA-serum），分子量为 67 kDa，是由 585 个氨基酸组成的单链的非糖蛋白质，具有特异性地抑制胰蛋白酶的活性（Zhang et al，2005）。它以一种全新的机制抑制胰蛋白酶，为丝氨酸蛋白酶抑制剂家族增添了新类型。两栖类动物有较多的天敌，而大蹼铃蟾皮肤及血清白蛋白具有极强的胰蛋白酶抑制活性，故推测其是作为大蹼铃蟾抵御天敌吞食的一种防御手段。为进一步验证此推测，我们从非洲爪蟾的血清中也分离纯化到其血清白蛋白，经测定也具有胰蛋白酶抑制活性，现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

非洲爪蟾由中国科学院昆明动物研究所马普二组惠赠。Superfine G-75、Resource Q 及 Mono-Q 柱层析介质为 Amersham Pharmacia 公司产品；生色底物 L-Benzoyl-L-arginine-*p*NA（BA*p*NA）、*p*-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate hydrochloride（NPGB）为 Sigma 公司产品；TEMED、丙烯酰胺为 Fluka 公司产品；其他试剂均为进口或国产分析纯。胰蛋白酶（type I）为 Sigma 公司产品，用 NPGB 在含有 0.02 mol/L $CaCl_2$ 的 0.1 mol/L 巴比妥缓冲液（pH 8.6）中进行反应活性滴定（Chase & Shaw，1967）。经测定，具有活性的胰蛋白酶占总酶量的（97 ± 2）%，因此认为所用胰蛋白酶全部具有活性。本实验中的蛋白质浓度均采用 Bio-Rad 蛋白质定量试剂，以牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）为标准测定。

1.2 非洲爪蟾的血清制备

4 只成年非洲爪蟾（平均体重 50 ~ 80 g）用乙醚麻醉后，剪开腹腔进行心脏取血，血液于 37 ℃保温 1 h，再于 4 ℃放置 4 h，1 000 *g* 离心 10 min，收集血清，－80 ℃保存。

1.3 非洲爪蟾 68 kDa 血清白蛋白（XpA-serum）的分离纯化

1.3.1 AKTA® FPLC Superfine G-75 凝胶过滤层析　1 mL 非洲爪蟾血清置于分子量排阻范围为 12 ~ 14 kDa 的透析袋内，于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）中 4 ℃透析过夜。将透析后的血清 5 000 *g* 离心 10 min，0.22 μm 滤膜过滤后上样于用含有 0.1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）平衡的 AKTA® FPLC Superfine G-75 凝胶过滤柱（柱体积 200 mL），流速 1.5 mL/min，同样缓冲液洗脱，监测 280 nm 光吸收变化及电导检测。SDS 电泳判断含血清白蛋白组分峰。

1.3.2 AKTA® FPLC Resource Q 离子交换层析　用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）平衡离子柱（柱体积 1 mL），将 G-75 凝胶过滤层析所得含目的蛋白质组分峰用相同缓冲液透析后，同样离心过滤后上样，流速 2 mL/min，用平衡缓冲液冲洗 15 min，再用 0 ~ 0.3 mol/L NaCl，25 min 进行梯度洗脱。

1.3.3 AKTA® FPLC Mono Q HR 5/5 离子交换层析　用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 8.0）平衡离子柱（柱体积 1 mL），将 Resource Q 离子交换层析所得组分峰用相同缓冲液透析后，同样离心过滤后上样，流速 1 mL/min，用平衡缓冲液冲洗 8 min，再用 0.2 ~ 0.5 mol/L NaCl，22 min 进行梯度洗脱。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE 和 Native-PAGE 参考 Laemmli（1970）的方法。SDS-PAGE 中，纯化的样品在含 2.5% SDS 的上样缓冲液（非还原状态）或在含 2.5% SDS 和 5% 的 β－巯基乙醇的上样缓冲液（还原状态）中，100 ℃处理 5 min。凝胶于含 0.1% 考马斯亮兰的甲醇:乙酸:水（3:1:6）中染色或银染。

1.5 N－末端氨基酸序列测定

纯化的蛋白质在还原状态下进行 10% SDS-PAGE，电泳完成后，将凝胶上的蛋白质电转移至 PVDF 膜上，考马斯亮兰 R-250 稍许染色，剪下对应条带用氨基酸自动序列仪（ABI 476A 型）进行 N－端序列分析。

1.6 XpA-serum 的胰蛋白酶抑制活性测定

在含有 1 mmol/L $CaCl_2$ 的 50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.8）的 1 mL 反应体系中，测定纯化的 XpA-serum 对胰蛋白酶水解生色底物的抑制影响。将不同量的纯化 XpA-serum（终浓度 10 ~ 180 nmol/L）

与胰蛋白酶（终浓度 30 nmol/L）于 25 ℃保温 15 min，加入 BA*p*NA（终浓度 2 mmol/L）起始反应。连续 2 min 于 410 nm 处监测对-硝基苯胺的释放。

XpA-serum 对胰蛋白酶的抑制稳定性测定方法同上。30 nmol/L 胰蛋白酶分别与反应缓冲液、180 nmol/L XpA-serum、45 nmol/L BmA-serum 或 180 nmol/L BSA 于 25 ℃保温，时间分别为 0.5、1、4、8、12、16、20 和 24 h。以未保温的 30 nmol/L 胰蛋白酶活力为 100%，计算剩余酶活力。

1.7 XpA-serum 与胰蛋白酶结合动力学常数的测定

用 BIA3000（Biacore，Uppsala，Sweden）测定 XpA-serum 与胰蛋白酶结合动力学常数。5 μg/mL 胰蛋白酶溶于 10 mmol/L NaAc（pH 5.0）中，用胺偶联试剂盒固定于 carboxymethyl-dextran CM5 蕊片的 4 通道。方法如下：4 通道先用 N-ethyl-N′-（3-dimethylaminopropyl）carbodiimide HCl/N-hydroxy-succinimide 活化，然后注射溶于 NaAc 的胰蛋白酶到 450 RU，再用 ethanolamine HCl 封闭。3 通道同样被活化后，直接封闭作为对照。实验条件均为 25 ℃，流速 35 μL/min，缓冲液为含有 150 mmol/L NaCl、3 mmol/L EDTA、0.005% P_2O 的 10 mmol/L HEPES（pH 7.4）。不同浓度的 XpA-serum（10 nmol/L～3 μmol/L）流过通道 3 和 4，结合时间 3 min，解离时间 5 min，每一循环后的再生条件为 10 mmol/L glycine-HCl（pH 3.0）再生 9 s。所得传感图用 BIAevaluation 分析软件 4 进行 1∶1 Langmuir 结合模式拟合。

2 结果与分析

2.1 XpA-serum 的分离纯化

非洲爪蟾血清经 AKTA® FPLC Superfine G-75 凝胶过滤层析共获得两个峰（图 1A），经 SDS-PAGE 发现 68 kDa 的 XpA-serum 主要分布在第Ⅱ峰，收集第Ⅱ峰进一步分离。经 AKTA® FPLC Resource Q 离子交换层析后，在 0.15 mol/L NaCl 梯度得到一个主峰（图 1B），收集该峰进行 AKTA® FPLC Mono Q HR 5/5 离子交换层析，在 0.3 mol/L NaCl 梯度得到一个主峰（图 1C），对该组分进行活性分析。对从血清得到的 68 kDa 纯化组分进行 N-末端氨基酸序列测定，所得结果与 Moskaitis et al（1989）由非洲爪蟾血清白蛋白的 cDNA 序列推导的氨基酸序列一致。证明我们得到的是 68 kDa 的非洲爪蟾血清白蛋白。

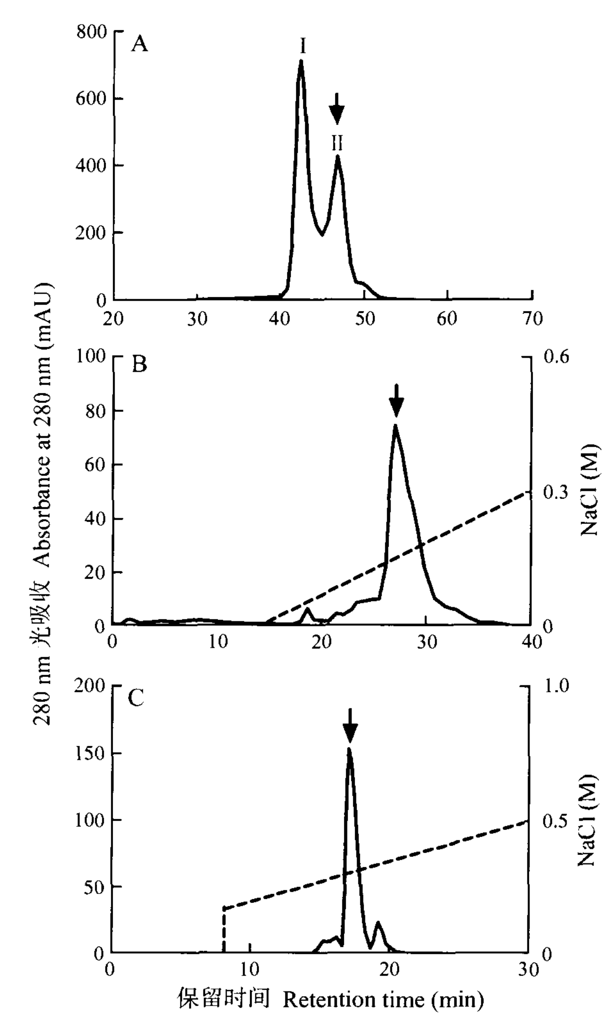


图 1 非洲爪蟾 68 kDa 血清白蛋白的分离纯化流程图

Fig. 1 Purification of 68 kDa serum albumin from *Xenopus laevis*

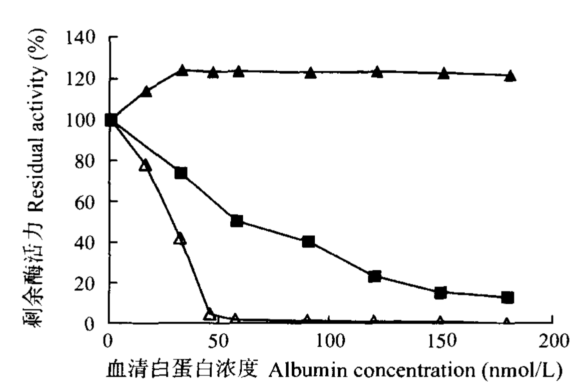
A：血清经 AKTA® FPLC Superfine G-75 凝胶过滤层析；B：AKTA® FPLC Superfine G-75 凝胶过滤层析所得第二峰经 AKTA® FPLC Resource Q 离子交换层析；C：AKTA® FPLC Resource Q 的主峰经 AKTA® FPLC Mono Q HR 5/5 离子交换层析。箭头代表活性组分峰。

A：Gel filtration of *X. laevis* serum on AKTA® FPLC Superfine G-75 column；B：AKTA® FPLC Resource Q chromatography of peak Ⅱ of G-75 column；C：The main peak of AKTA® FPLC Resource Q was finally loaded on AKTA® FPLC Mono Q HR 5/5 column. Fraction containing 68 kDa XpA-serum was indicated by arrow.

2.2 胰蛋白酶抑制活性测定结果

对 XpA-serum 进行胰蛋白酶抑制活性测定发现，它具有抑制胰蛋白酶的活性。180 nmol/L 的 XpA-serum 能抑制 30 nmol/L 胰蛋白酶 84%的活性；而 45 nmol/L 的 BmA-serum，就完全抑制了 30 nmol/L 的胰蛋白酶的活性；BSA 则完全无抑制

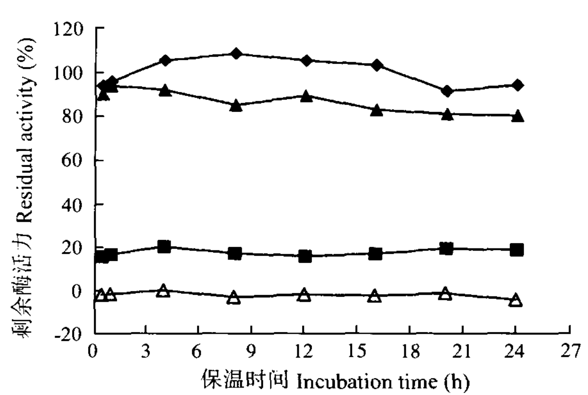
(图 2)。将 30 nmol/L 胰蛋白酶同 180 nmol/L XpA-serum 保温 15 min 时，可以抑制 84%的胰蛋白酶活性；当保温时间延长至 24 h 时，仍然可以抑制 80%左右的胰蛋白酶活性。而 45 nmol/L 的 BmA-serum 保温 15 min 完全抑制了 30 nmol/L 的胰蛋白酶活性，直至保温 24 h。说明 XpA-serum 同 BmA-serum 一样，对胰蛋白酶的抑制具有相当的稳定性。BSA 对胰蛋白酶的活性则无明显影响（图 3）。



■非洲爪蟾血清白蛋白 XpA-serum；△大蹼铃蟾血清白蛋白 BmA-serum；▲牛血清白蛋白 BSA。

图 2　三种来源的血清白蛋白对胰蛋白酶的抑制活性

Fig. 2　Trypsin inhibitory activity of serum albumin from three kinds of animals



◆缓冲液 Buffer；▲牛血清白蛋白 BSA；■非洲爪蟾血清白蛋白 XpA-serum；△大蹼铃蟾血清白蛋白 BmA-serum。

图 3　非洲爪蟾 68 kDa 血清白蛋白抑制胰蛋白酶的稳定性

Fig. 3　Time-stability of the inhibition of 68 kDa serum albumin from *X. laevis* on trypsin activity

BmA-serum 与一定量胰蛋白酶保温后进行 Native-PAGE，可以观察到其与胰蛋白酶形成的复合物条带的出现，而 BSA 或 XpA-serum 与胰蛋白酶保温后均无复合物条带出现，但随胰蛋白酶量的增加，BSA 逐渐被水解，蛋白质条带逐渐减弱，XpA-serum 则无明显的量变化（图 4）。用表面等离子共振法测定 XpA-serum 与胰蛋白酶的结合动力学常数，解离平衡常数为 $K_D = 1.44 \times 10^{-6}$ mol/L。

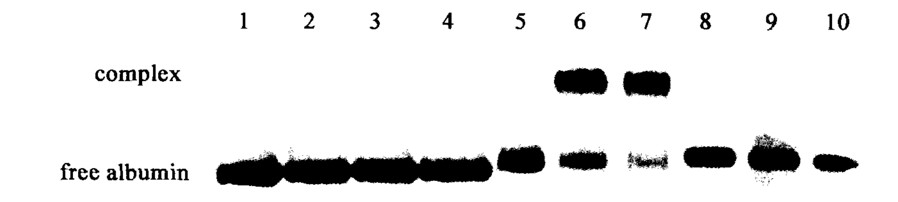


图 4　三种来源的血清白蛋白同胰蛋白酶保温复合物的 Native-PAGE

Fig. 4　Native-PAGE of the mixture of trypsin and serum albumin from three kinds of animals

泳道 1：XpA-serum（2.5 μmol/L）；泳道 2、3、4：XpA-serum（2.5 μmol/L）与不同量的胰蛋白酶（分子摩尔比为 1:0.1，1:0.5，和 1:1）于 25 ℃保温 15 min；泳道 5：BmA-serum（1.85 μmol/L）；泳道 6、7：BmA-serum（1.85 μmol/L）与不同量的胰蛋白酶（分子摩尔比为 1:0.5，和 1:1）于 25 ℃保温 15 min；泳道 8：BSA（1.85 μmol/L）；泳道 9、10：BSA（1.85 μmol/L）与不同量的胰蛋白酶（分子摩尔比为 1:0.5，和 1:1）于 25 ℃保温 15 min。

Lane 1，XpA-serum（2.5 μM）；lane 2，3，and 4，XpA-serum（2.5 μM）were incubated with trypsin at different molar ratio 1:0.1，1:0.5，and 1:1 for 15 min at 25 ℃；lane 5，BmA-serum（1.85 μM）；lane 6 and 7，BmA-serum（1.85 μM）were incubated with trypsin at different molar ratio 1:0.5 and 1:1；lane 8，BSA（1.85 μM）；lane 9 and 10，BSA（1.85 μM）were incubated with trypsin at different molar ratio 1:0.5 and 1:1.

3 讨　论

通过凝胶过滤层析和离子交换层析，我们从非洲爪蟾的血清中分离纯化到其 68 kDa 的血清白蛋白。经 N-末端氨基酸序列分析，所得 N-末端与文献报道的序列一致。XpA-serum 也具有胰蛋白酶抑制活性，但相对于大蹼铃蟾白蛋白，其抑制活力较低，前者完全抑制 30 nmol/L 胰蛋白酶的量比后者要高四倍左右。XpA-serum 与胰蛋白酶的解离平衡常数 $K_D = 1.44 \times 10^{-6}$ mol/L，而 BmA-serum 的 $K_D = 1.55 \times 10^{-9}$ mol/L，两者相差 3 个数量级，说明后者的胰蛋白酶抑制活力要远大于前者。BmA-

serum通过由一对二硫键 Cys^{53}-Cys^{62}形成的一个暴露的活性位点环，以1:1分子摩尔比同胰蛋白酶形成稳定的非共价结合的复合物，反应活性位点为 Arg^{58}（P_1）-His^{59}（P_1'）（Zhang et al，2005）。目前还没有发现哺乳动物血清白蛋白具有胰蛋白酶抑制活性。对XpA-serum、BmA-serum、HSA和BSA进行氨基酸序列比较发现，XpA-serum和BmA-serum序列中的第58位氨基酸分别为Lys和Arg，而在后两者中则为Ser，这可能是它们没有胰蛋白酶抑制活性的主要原因。XpA-serum同BmA-serum相比，胰蛋白酶抑制活力较低，这可能是由于反应活性位点环的氨基酸序列变异较大引起的。因为在丝氨酸蛋白酶与抑制剂的相互作用中，除剪切位点外，其两侧的次级结合位点也发挥较重要的作用（Bode & Huber，1992）。另外，在Native-PAGE凝胶上可明显观察到BmA-serum同胰蛋白酶形成的复合物，而XpA-serum与胰蛋白酶保温后则观察不到复合物的形成，这或许与XpA-serum的抑制活力较低有关。而且XpA-serum的解离平衡常数比BmA-serum高3个数量级，观察不到复合物可能也与XpA-serum同胰蛋白酶形成的复合物在反应平衡中解离速度较快有关。

经酶联免疫吸附实验研究发现，兔抗BmA-skin血清能与非洲爪蟾68 kDa的XpA-serum发生免疫交叉反应，抗体滴度为1:1 000，而与BmA-serum发生免疫交叉反应的抗体滴度为1:100 000，证明非洲爪蟾68 kDa的XpA-serum同BmA-serum具有部分相似的抗原决定簇。非洲爪蟾的皮肤匀浆物也与兔抗BmA-skin血清发生免疫交叉反应，抗体滴度为1:100左右，证明在皮肤中也存在有68 kDa的XpA-serum。

丝氨酸蛋白酶抑制剂广泛存在于动物、植物、微生物体中。在动物体中，丝氨酸蛋白酶抑制剂是维持体内环境稳定的重要因素，一旦平衡失调即导致多种疾病，任何影响其活性的因素也会造成严重的病理性疾病。它们最基本的功能是防止不必要的蛋白水解，调节丝氨酸蛋白酶的水解平衡。因此，作为调控物，丝氨酸蛋白酶抑制剂在机体的生理活动中扮演着重要的角色（Laskowski & Qasim，2000）。在植物中，丝氨酸蛋白酶抑制剂的主要功能是防御其采食者。因此我们认为非洲爪蟾及大蹼铃蟾血清白蛋白除了执行常规的生理功能外，其胰蛋白酶抑制活性，很可能直接或间接地参与到抵御天敌的行为中，这较好地说明了物种具有适应其特殊生活环境的能力。

参考文献：

Bode W, Huber R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases [J]. *Eur J Biochem*, **204** (2): 433 - 451.

Chase T Jr, Shaw E. 1967. *p*-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: A new active site titrant for trypsin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **29** (4): 508 - 514.

Follett BK, Redshaw MR. 1974. In: Lofts B. Physiology of the Amphiba [M]. New York: Academic Press, 219 - 308.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, **227**: 680 - 685.

Laskowski M, Qasim MA. 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1477** (1 - 2): 324 - 337.

Moskaitis JE, Sargent TD, Smith LH Jr, Pastori RL, Schoenberg DR. 1989. *Xenopus laevis* serum albumin: Sequence of the complementary deoxyribonucleic acids encoding the 68- and 74-kilodalton peptides and the regulation of albumin gene expression by thyroid hormone during development [J]. *Mol Endocrinol*, **3** (3): 464 - 473.

Peters T Jr. 1996. All about albumin: Biochemistry, genetics, and medical application [M]. New York: Academic Press, Inc.

Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5Å resolution [J]. *Protein Eng*, **12** (6): 439 - 446.

Zhang YX, Lai R, Lee WH, Zhang Y. 2005. Frog albumin is expressed in skin and characterized as a novel potent trypsin inhibitor [J]. *Protein Sci*, **14** (9): 2469 - 2477.